

# 遺伝子組換え法によって生産したヒト成長ホルモン (hGH) の抽出, 活性回復および精製

岡 村 真 延  
小 田 顕 彦  
瀬 戸 弘 司

## Extraction, Refolding and Purification of Recombinant Human Growth Hormone (hGH)

Masanobu OKAMURA  
Akihiko ODA  
Koji SETO

Recombinant human growth hormone (hGH) was produced by the genetic engineering method. After extraction in denatured form, it was refolded to active one. Crude hGH was purified by HPLC and tested for biological activities. Purified hGH was found to be effective in increasing not only bone length but also body weight of hypophysectomized rats.

### 1. はじめに

脳下垂体性小人症の特効薬であるヒト成長ホルモン (hGH) は, これまで, 人の死体の脳下垂体から得られる抽出 hGH が用いられており, 需要に対して供給は著しく少なく慢性的な不足が余儀なくされていた。成長ホルモンは, ヒトに対しては, ヒトの成長ホルモンのみが有効であることから, hGH の安定的かつ大量の生産が要望されていた。

一方, 近年の遺伝子工学技術の進歩は著しく, いくつかのペプチドや蛋白質が微生物あるいは動物細胞を用いて作られており, 当 hGH<sup>1)</sup>, ソマトスタチン<sup>2)</sup>, およびインシュリン等<sup>3,4)</sup> は医薬品として市場に出されるまでになっている。科学技術庁の科学振興調整費によるプロジェクト「DNA の抽出, 解析, 合成技術に関する研究」において大阪大学池原教授らは, 合成した DNA トリマーを用いて hGH の遺伝子を合成し, 大腸菌に組み込ませることに成功した。

それを受けて当社は, hGH の製造プロセスの開発に取り組みることになった。

大腸菌による hGH の生産は, hGH 組換え大腸菌の培養, 目的蛋白質の抽出, 活性蛋白質への変換, 分画精製および有害物質の除去よりなる。一般に大腸菌によ

て生産した異種蛋白質は, 不活性型で存在する。そのため目的物質を分解せず抽出させ, さらに抽出した蛋白質は, そのままでは活性体ではないため, 活性体への変換 (リフォールディング) が必要となる。リフォールディングに関しては, 定説が知られておらず試行錯誤の実験が必要である。

本報告では, hGH 組換え大腸菌を培養した菌体からの hGH の抽出, リフォールディングおよび精製, さらに得られた純化 hGH の生物活性についてのべる。

この hGH 調製法で得られた純化 hGH の生物活性 (脳下垂体摘出ラットの骨の成長活性等) を調べたところ天然の hGH と同様の活性を有することがわかった。

### 2. 組換え大腸菌の培養

#### (1) 前培養培地組成

カザミノ酸	0.4g
MgSO <sub>4</sub> (0.1 M)	1.0 ml
CaCl <sub>2</sub> (0.01 M)	1.0 ml
グルコース (20%)	2.0 ml
M9 塩液*	10.0 ml
サイアミン (2 mg/ml)	0.1 ml
アンピシリン (20 mg/ml)	0.1 ml

水で 100 ml に調整する。

\*M 9 塩液

NaCl	5 g
NH <sub>4</sub> Cl	10 g
NaHPO <sub>4</sub>	70 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 g

上記塩類を蒸留水に溶解し 1000 ml とした。

(2) 本培養培地組成

(1) 基本培地組成

カザミノ酸	16.0 g
酵母エキス	16.0 g
MgSO <sub>4</sub> (0.1 M)	80.0 ml
CaCl <sub>2</sub> (0.01 M)	80.0 ml
グルコース (20%)	160.0 ml
M-9塩液	800.0 ml
サイアミン (2 mg/ml)	8.0 ml
アンピシリン (20 mg/ml)	8.0 ml

(2) フィード液組成

- グルコース
- カギミノ酸
- 酵母エキス

(3) 消泡剤

ANTI FOAM AF-EMULSION (10%)

*E. coli* HB101/pGH-L9<sup>5)</sup> を 121°C で滅菌した上記前培養培地に植菌し, 37°C 8時間培養し前培養液とした。

本培養は, 滅菌済みの14 l 用醗酵槽 (液量8 l) に前記培養液 400 ml を植菌し, 37°C 16時間培養を行った。培養は DO 制御を行い菌の増殖に伴ってフィード液および3インドールアクリル酸 (IAA) を添加した。本培養の経時変化を測定すると Fig. 1 のようになる。ここで hGH の生成量は, 15% SDS-PAGE によって測定した全蛋白質に対する hGH の百分率 (%), 菌体量は吸光度 OD<sub>660</sub>, またプラスミド DNA の数は培養液 1 ml 当りの個数でそれぞれ示した<sup>6)</sup>。

3. hGH の抽出, 活性回復および精製法の検討

*E. coli* HB101/pGH-L9 の培養後 hGH は菌体内に不溶物として存在するため, 目的 hGH を可溶化抽出する必要がある。まず, 各種薬剤による可溶化効率の検討を行った。可溶化後の SDS-ゲル電気泳動パターンを Fig. 2 に示す。用いたほとんどの可溶化剤は hGH を可溶化することがわかったが, SDS が最もよく hGH を可溶化した。このことから hGH の可溶化剤として, SDS を採用することにした。なお, 細胞壁溶解酵素として知られているリゾチームを用いた hGH の可溶化および抽出効率は, SDS の場合と比較してはるかに効果

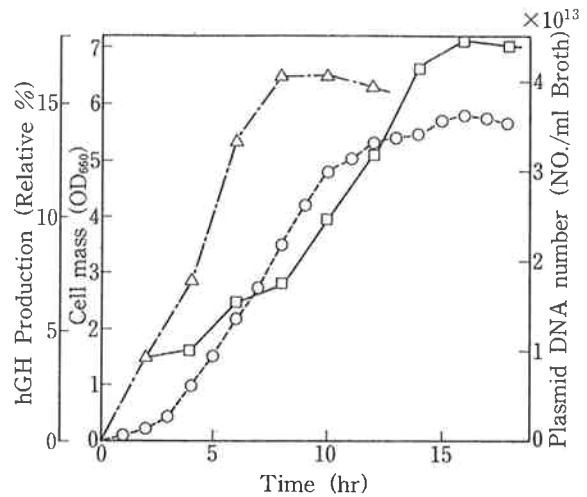


Fig. 1. Time-course of cultivation of *E. coli*  
 ◇ : Plasmid DNA number  
 ○ : Cell mass  
 □ : hGH production

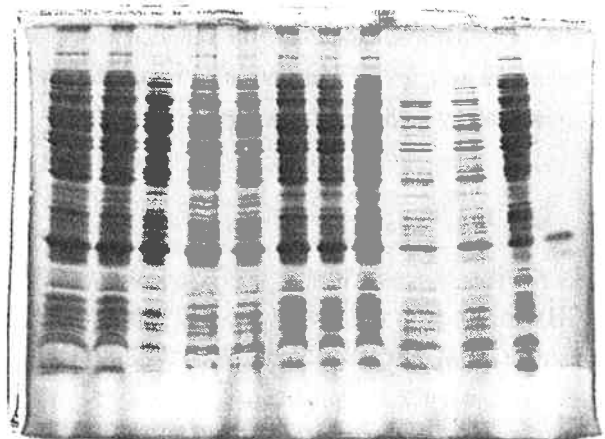


Fig. 2 15% SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of soluble portion obtained from *E. coli* by following reagents and sonication, followed by centrifuge (at 15000 rpm, for 30 min)

Used reagents were, from the left, SDS 0.5 M, 0.1 M, 0.05 M, Guanidine hydrochloride 10 M, 6 M, Urea 20 M, 15 M, 10 M, NaSCN 10 M, 6 M, without reagent, standard hGH.

が小さかった。

次に可溶化したものからの hGH の抽出を試みた。抽出剤として有機溶媒による抽出を試みた。各種アルコール (C<sub>2</sub>~C<sub>6</sub>) の中では, sec-ブチルアルコールが特異的に hGH を抽出し, 他のものは無効だった。

有機溶剤である sec-ブチルアルコール中に存在して

いる hGH を, 別の水溶性有機溶剤を用いて溶解度差による分画を試みた。各種水溶性有機溶剤による hGH の沈澱能は, イソプロパノール>アセトン>エタノール>メタノールの順であったが, イソプロパノールは蛋白質と強く結合している脂質の除去に適していることから, ここではイソプロパノールを用いることにした。

菌体から可溶化抽出された hGH はこのままでは活性体の構造を保持していないため, 蛋白質の巻き戻し (リフォールディング) をおこなう必要がある。まず変性剤を用いて蛋白質の分子構造をほどいた後, 加えた変性剤を除くか希釈することにより自然に活性体に巻き戻すことを試みた。変性剤としてよく用いられている塩酸グアニジン, 尿素, および SDS に注目し, この三者によるリフォールディングの検討を試みた。尿素および SDS は, 高濃度添加の条件でもイソプロパノールによって沈澱した hGH を十分に可溶化できないことがわかった。一方, 6 M 以上の塩酸グアニジン存在下の条件では, hGH を含む沈澱物を完全に可溶化することができることから, 可溶化・リフォールディング剤として塩酸グアニジンを用いて検討を進めた。塩酸グアニジン 6 M を含むリン酸緩衝液 (pH 6.8) で可溶化後, リン酸緩衝液 (pH 6.8) で 6 倍に希釈し 4°C で一晩放置した。その一部をとって hGH の活性を RIA 法によって測定したところ活性がみられリフォールディングしていることが示唆された。リフォールディングの際, ジチオスレイトール (DTT)<sup>7)</sup> あるいはグルタチオン (還元型及び酸化型)<sup>8)</sup> の添加効果を見たが効果的ではなかった。

可溶化に塩酸グアニジンが有効であり, 希釈によって活性体へ変換できることから, 塩酸グアニジンで可溶化後, 精製中にリフォールディングを行なわせることを試みた。可溶化液を直接 TSK gel G 3000SW にチャージし溶出液としてリン酸緩衝液 (30 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 6.8) を用いて溶出することにより, 希釈によるリフォールディングと精製を同時に行った (Fig. 3)。

Fig. 3 からわかるように hGH のピークが確認され, リフォールディングと精製が同時に行えることがわかった。

さらに精製を行うため, hGH に相当するフラクションを TSK gel DEAE-5PW にかけて精製した。その結果を Fig. 4 に示す。目的の hGH は鋭いピークとして現れ, 精製可能であることがわかった。得られた hGH の純度は, TSK gel G3000SW, 同 DEAE-5PW, 同 Phenyl-5PWRP, PAGE および SDS-PAGE により測定したが, いずれにおいても純粋の hGH に精製されていることがわかった。また, Kohr らの報告<sup>9)</sup> にしたがって測定した hGH のアミノ酸組成分析において計算

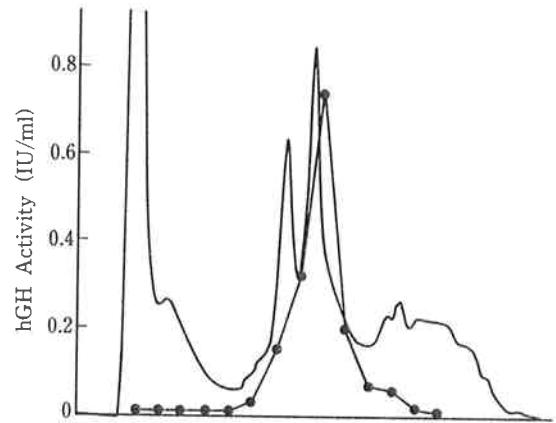


Fig. 3 TSK gel G3000SW Chromatography of Guanidine buffer soln.

Guanidine buffer soln. 5 ml, containing 17.4 mg protein was injected onto TSK gel G3000SW (21.5 mmID×60 cm). The elution solvent was 30 mM Phosphate buffer ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) pH 6.8, and a flow rate was 5 ml/min. The eluent was monitored at 280 nm.

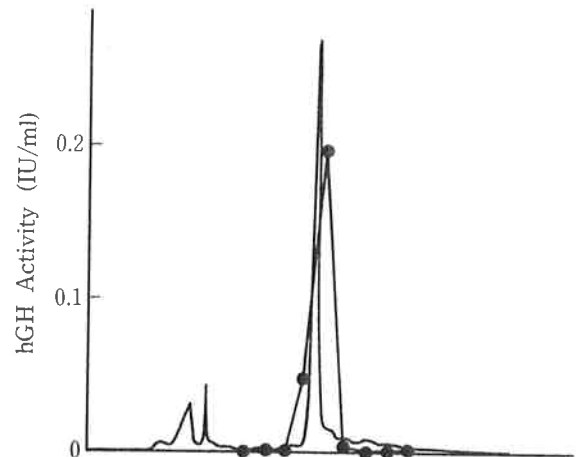


Fig. 4 TSK gel DEAE-5PW Chromatography of G3000SW fr.

G3000SW fr., 9 ml, containing 2.4 mg protein was injected onto TSK gel DEAE-5PW (21.5 mmID×15 cm). The elution solvents were 20 mM Glycine buffer (pH 8.0) (Solvent 1) and 20 mM Glycine buffer (pH 8.0) plus 0.5 M NaCl (Solvent 2). The elution conditions consisted of a linear gradient of 60 min from 100% Solvent 1 to 100% Solvent 2 at a flow rate of 4 ml/min. Detection of the elutant was at 280 nm.

値とよく一致する値が得られた。hGH の抽出精製法をまとめると Fig. 5 のようになる。また、各ステップにおける活性および精製収率をまとめると Table 1 のようになる。

以上のごとく、遺伝子組換え体を培養して菌体内に生成した不溶性かつ不定形の hGH を可溶化、抽出、リフォーミングおよび精製することによって純化することができたが、可溶化時に用いた SDS が完全に除けているかどうかは医薬品として考える場合重要な問題である。そこで精製した hGH の SDS 分析を行なった (Table 2)。SDS は、 $0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$  以下であり十分除けていることがわかった。

#### 4. 考 察

組換え体を用いての培養では、宿主の遺伝子とは別のプラスミド上にある遺伝子 (本来自分自身 (大腸菌) とは無関係ないいわゆる異種蛋白質 (hGH など) をコードし

た遺伝子) を発現させることから、通常とられる培養方法をそのままでは適用できない。宿主の培養特性とプラスミドの発現特性の両者を考慮した培養条件を構築しなければならない。本実験では宿主として *E. coli* HB101, プラスミドとして hGH 遺伝子を組み込んだ pGH-L9 を用い、流加培養法により発現量として hGH  $0.31 \text{ mg}/\text{ml}$  培養液をえることができた。

大腸菌内で生成した蛋白質は、通常不定形で存在し、大量の場合は、塊 (inclusion body) として菌体内に集合している。菌体破碎後は、宿主固有のプロテアーゼの攻撃を回避しつつ高収率で回収することが望ましい。

回収を行うためには、まず不溶状態で存在する hGH を可溶化することが必要であり、いくつかの可溶化剤を検討した結果 SDS が最も良い可溶化剤であることがわかった。SDS は強力な界面活性剤で、蛋白質を変性させることにより不溶性の蛋白質を容易に可溶化すること、また、プロテアーゼを失活させることにより hGH

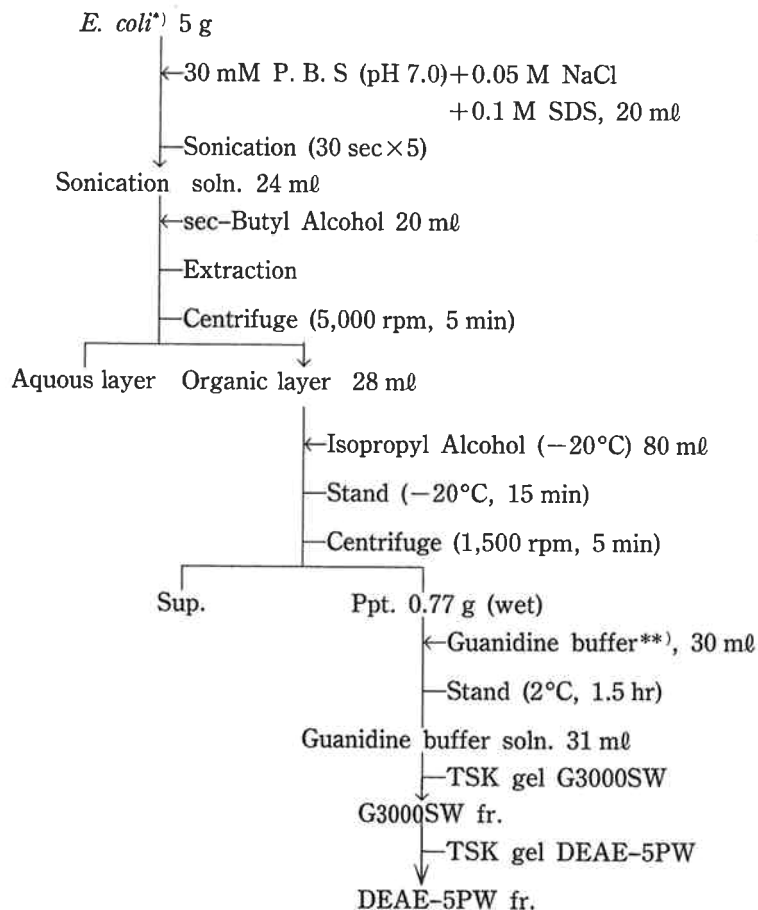


Fig. 5 Purification of hGH

\*) *E. coli* HB101/pGH-L9    \*\*) Guanidine buffer:

Mixture of 30 mM P. B. S ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{NaOH}$ ) pH 6.8, 50 mM NaCl, and 6 M Guanidine Hydrochloride.

Table 1 Purification of hGH

	hGH Activity IU/ml	Protein Conc. μg/ml	Specific Activity IU/μg	Total hGH Activity IU (%)
Expression in E. coli (Calculated)	0.62	2480	$0.25 \times 10^{-3}$ (1)	124(100)
Guanidine buffer soln.	3.00	3480	$0.86 \times 10^{-3}$ (3.4)	90.0(72.6)
G3000SW fr.	0.50	270	$1.85 \times 10^{-3}$ (7.4)	76.8(61.9)
DEAE-5PW fr.	0.46	230	$2.00 \times 10^{-3}$ (8.0)	56.4(45.5)

hGH activity was measured by radioimmunoassay(RIA) method and protein conc. was measured by using of Bio-Rad protein assay kit.

Table 2 Analysis of SDS and inorganic salts

	Existing conc. μg/ml
Na <sup>+</sup>	3800
Cl <sup>-</sup>	5900
Glycine	1000
K <sup>+</sup>	0.2 >
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.1 >
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0.4 >
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.1 >
Guanidine Hydrochloride	0.5 >
SDS	0.3 >

Sample was the fraction (hGH conc. 0.30 mg/ml) obtained by TSK gel DEAE-5PW.

Table 3 Tibia growth of rats

	Rat number	tibia length μm
Buffer	24	276±35
hGH	12	379±43
bovine GH	12	376±40

Total tibia lengths of hypophysectomized rats were treated for 4 days with 0.4 mg/kg/day GH.

の回収率の向上に有効であるなどの効果が期待された。SDS の変性過程は、まず少量の SDS が蛋白質の構造を緩めさらに大量の SDS が結合できるようになって蛋白質の構造を完全に解き変性させるといわれている<sup>10,11,12</sup>。高木らは、SDS ポリペプチド複合体のモデルとして、SDS がポリペプチド鎖の疎水性あるいは正電荷に富む部分へ結合したミセル状の結合モデルを提唱している<sup>13</sup>。このモデルによれば、蛋白質の処理に SDS を用いた場合簡単には SDS を除くことができにくいことが示唆される。しかしながら、表 2 に示したように我々の開発した抽出精製法により SDS はほぼ完全に除去されていることがわかった。この理由としては、(1)イソプロピルアルコール沈澱法により SDS と hGH の解離

が起こり、かつ hGH のみが沈澱する、(2)リフォールディングのために用いる 6 M 塩酸グアニジン添加により SDS と塩酸グアニジンとの複合体が生成し、引き続いて行う遠心分離によりこの複合体が沈澱し、SDS は溶液から除去される、さらに(3)精製で用いる TSK gel G3000SW および DEAE-5PW によってもそれぞれ分子量あるいは電荷の差より分離ができる、などが考えられる。

いずれにしても医薬品として用いる場合、SDS を除く必要があることから、本精製法は有効な手段といえる。

抽出に関しては、有機溶媒による単純抽出法が採用でき、これにより高い回収率をもって抽出が可能となった。その際かなりの精製度を上げることができること、また体積を小さくできることから、かなり純化したものでリフォールディングすることができた。リフォールディングの際、蛋白質分子間のインタラクションを避けることが必要とされており、その意味でもリフォールディング前にある程度の純化物 (>90%) にすることができたのは有効と考えられる。

塩酸グアニジンによるリフォールディングは、希釈によって行われるが、体積増加が大きくその後の精製に移行するためには、濃縮操作が必要である。そこで、希釈を兼ねて精製することで濃縮操作の短縮を試みた。TSK gel G3000SW は精製と同時にバッファー交換(塩酸グアニジン希釈に相当する)を行うことができる為、導入の可能性が大きいと考えられた。結果は予想通りリフォールディングと共に精製が可能であった。このことから塩酸グアニジンを用いてのリフォールディングには、ゲル濾過によるリフォールディングが有効であることがわかった。

hGH 中には 2 つのジスルフィド結合が存在するが、これらは活性発現にはあまり重要でないと考えられている<sup>14</sup>。今回我々が検討したジチオスレイトールあるいはグルタチオンの添加によりリフォールディング効率の向上が見られなかったのはこの点と関係があるものと思われる。

精製 hGH の生物活性測定は、脳下垂体摘出ラットを用いた活性測定法、すなわち体重測定および脛骨骨端部軟骨幅の増加テスト<sup>15,16)</sup>で行った。この結果を Fig. 6 および Table 3 に示す。明らかにコントロールと比較して生物活性を示し、精製 hGH が有効性であることが確認された。

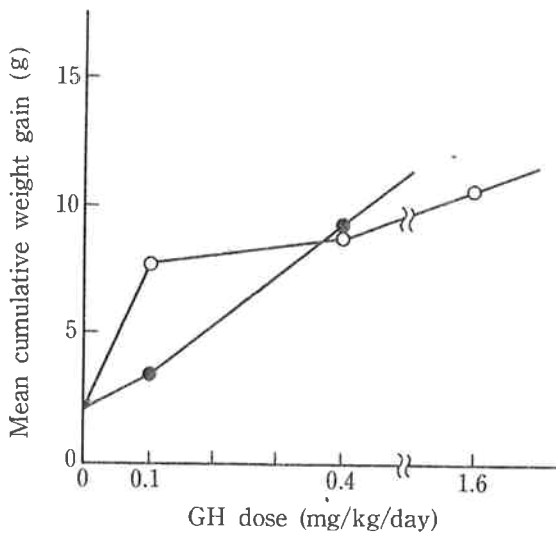


Fig. 6 Dose-response curve for GH. Mean cumulative weight changes of groups of twelve hypophysectomized rats after treatment subcutaneously daily for 4 days with various doses of GH;  
○ : hGH  
● : bovine GH

## 謝 辞

本研究を行なうにあたりご指導を賜りました池原森男

大阪大学名誉教授および大塚栄子北海道大学教授に深謝致します。また本研究遂行にご助力いただきました東洋曹達工業株式会社の五十嵐辰夫氏、竹本久雄氏および加藤芳男氏に深謝致します。

## 文 献

- 1) Goeddel, D. V. et. al., *Nature*, **281**, 544 (1979)
- 2) Itakura, K., et. al., *Science*, **198**, 1056 (1977)
- 3) Crea, R. et. al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 5765 (1978)
- 4) Goeddel, D. V., et. al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 106 (1979)
- 5) M. Ikehara et. al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 5956 (1984)
- 6) D. S. Holmes. et. al., *Anal. Biochem.*, **114**, 193 (1981)
- 7) 石井一行, 安藤俊夫; *生化学*, **56**(1), 50 (1984)
- 8) スチュアート エリオット ビルダ; 公開特許公報 (A) 昭59-161321
- 9) W. J. Kohr et. al., *Anal. Biochem.*, **122**, 348 (1982)
- 10) A. Ray et. al., *Biochem.*, **5**, 2606 (1966)
- 11) J. A. Reynolds et. al., *Biochem.*, **6**, 937 (1967)
- 12) T. Takagi et. al., *J. Biochem.*, **77**, 939 (1975)
- 13) 高木俊夫他, *蛋白質核酸酵素*, **21**, 811 (1976)
- 14) T. Tokunaga et. al., *Eur. J. Biochem.*, **153**, 445 (1985)
- 15) F. S. Greenspan et. al., *Endocrinology*, **45**, 455 (1949)
- 16) K. C. Olson et. al., *nature*, **293**, 408 (1981)